

Respuesta antifosforilcolina de ratones autoinmunes NZB/W: variaciones con la edad del título y homogeneidad de los sueros

R. Seoane, J. Faro, I. Lareo, A. Eiras y B. J. Regueiro*

Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina
Universidad de Santiago de Compostela
La Coruña (España)

(Recibido el 22 de septiembre de 1986)

R. SEOANE, J. FARO, I. LAREO, A. EIRAS and B. REGUEIRO. *Antiphosphorylcholine Responses of Autoimmune NZB/W Mice: Age-Dependent Variations in Antibody Titers and Homogeneities of Sera*. Rev. esp. Fisiol., 43 (2), 151-156, 1987.

Antibody titers and avidity of sera of autoimmune NZB/W mice in responses induced by different antigens were determined. Results show an age-dependent decrease of the antibody titer in sera from female mice immunized with phosphorylcholine coupled to keyhole limpet haemocyanin. This decrease was not detected when using as immunogen an antigenic preparation of *Neisseria meningitidis* that naturally induces anti-phosphorylcholine antibodies, but was detected with a modification of this antigen (heat inactivation and further coupling with the hapten). Determinations of inhibition profiles of antisera suggest that this loss of immune competence is paralleled by a decrease in avidity and homogeneity of antisera. This finding may be related to the loss of idiotypic clonal dominance recently reported to occur in these mice.

Key words: NZB/W mice, Anti-PC response, Autoimmunity, Antibody titer.

Los ratones híbridos (NZB $\times$ NZW) F_1 (NZB/W) desarrollan de forma espontánea un síndrome autoinmune predeterminado genéticamente que presenta una sintomatología muy similar al lupus eritematoso sistémico humano (17). Este síndrome está caracterizado por diferentes alteraciones inmunológicas entre las que destacan una activación policlonal anormal de las células B (8), una incapacidad

de generar células T de memoria (13) y una gran resistencia al bloqueo de las células efectoras por el antígeno (9), alteraciones que podrían explicar su hipereactividad y resistencia a la inducción de tolerancia (6).

Como consecuencia de estos defectos la respuesta de estos ratones está muy alterada de tal modo que ratones de una semana de edad producen respuestas de anticuerpos comparables a las obtenidas en ejemplares adultos, mientras que en razas no autoinmunes este nivel de res-

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

puesta no se alcanza hasta las 4 ó 5 semanas de edad (2). Además, la maduración de la afinidad se produce con mucha mayor rapidez en los ratones de Nueva Zelanda que en controles no autoinmunes de su misma edad. Sin embargo, esta hiperreactividad de los ratones jóvenes desaparece con el desarrollo de la enfermedad, y así, se observa un progresivo descenso en la capacidad de respuesta, tanto a antígenos timodependientes como timoindependientes (10) que, en el caso de la respuesta anti-fosforilcolina (PC) puede estar acompañada de una pérdida del dominio clonal del idiotipo T15 (14).

En el presente trabajo se estudian los contenidos séricos de anticuerpos IgM anti-PC y las variaciones en los perfiles de inhibición con hapteno de los sueros en respuestas inducidas por la inyección de diferentes antígenos en ratones NZB/W de diferentes edades. Los resultados demuestran que el defecto de la respuesta anti-PC de los ratones viejos alcanza también a los niveles de anticuerpos circulantes y afecta, especialmente, a los anticuerpos de mayor afinidad.

Material y Métodos

Animales. — Se cruzaron en nuestro animalario ratones machos NZW y hembras NZB (OLAC 1976 Ltd. Inglaterra) para obtener los ratones híbridos NZB/W, de los que se mantuvo un estricto control de la edad. Para la obtención de algunos reactivos se utilizaron también conejos blancos de Nueva Zelanda.

Los animales se mantuvieron en nuestras instalaciones con aporte de agua y comida *ad libitum* y un ritmo nictameral de 12:12.

Antígenos e inmunizaciones. — Todos los experimentos se realizaron con lotes de suero procedentes de 3-6 animales inyectados con uno de los tres antígenos

utilizados. Mediante diazotización de la hemocianina de lapa (KLH, Calbiochem-Behring, USA) por el método de QUAN *et al.* (11) se obtuvo el PC-KLH. Las preparaciones antigénicas de meningococo se obtuvieron por la técnica de FARO *et al.* (4). La denominada NMB corresponde a una preparación antigénica obtenida por autólisis de un cultivo de *Neisseria meningitidis* serogrupo B cepa M986 (48 horas a 4°C) y la PC-(NMB)HI a un antígeno obtenido por acoplamiento de fosforilcolina al antígeno anterior inactivado por calor (121°C durante 10 min). Las dosis inmunizantes fueron 200 µg en el caso del PC-KLH y 0,1 ml de una suspensión en solución salina, ajustada al 86% de transmitancia a 530 nm, para los antígenos meningocócicos. En ambos casos la inmunización se realizó por vía intravenosa.

ELISA para la detección de anticuerpos anti-PC y obtención de los perfiles de inhibición. — El antisuero revelador utilizado fue un suero de conejo monoespecífico anti-IgM de ratón, obtenido por la técnica de VAITUKAITIS (18), purificado por inmunoabsorción y acoplado a biotina (19).

Se adsorbieron placas de 96 pocillos de cloruro de polivinilo (Flow Laboratories, USA) con 50 µl de fosforilcolina acoplada a seroalbúmina bovina (BSA, Sigma) (PC-BSA), diluida en tampón borato salino (0,2 M, pH=8,5) a una concentración de 10 µg/ml, durante tres horas a 37°C y una noche a 4°C. Las placas se lavaron con solución salina con un 0,005% de Tween-20 (Analema, España) (SS-T) y se bloquearon con una solución de BSA al 0,5% en tampón fosfato salino (PBS) durante dos horas a 37°C. Tras un nuevo lavado con SS-T, se añadieron 50 µl de diluciones seriadas 1/3 del suero en PBS con un 1% de BSA y un 0,005% de Tween-20 (PBS-T-BSA) y se incubó dos horas a 37°C. Tras lavar con SS-T, se adicionaron 50 µl de antisuero revelador;

se incubó dos horas a 37°C y tras un nuevo lavado se añadieron 50 µl de avi-dina acoplada a fosfatasa alcalina (AAP, Sigma). Después de incubar durante 45 min a 37°C y lavar los pocillos con SS-T, se incorporaron 100 µl de p-nitrofenilfosfato (Sigma), se desarrolló la reacción durante 15 min a temperatura ambiente y se midieron las absorbancias a 405 nm en un espectrofotómetro multicanal Titertek Multiskan (Flow Laboratories, USA). El ajuste de los datos obtenidos a una sigmoide se realizó por un método estadístico de ajuste a la normal, desarrollado por nosotros, que proporciona como parámetros definitorios de la curva la media y la desviación típica. El título de anticuerpos se definió como la dilución de suero que muestra una absorbancia de 0,1 unidades y se calculó por el método de CAUFIELD y SHAFFER (1). En todos los ensayos se incorporó un control interno con el anticuerpo monoclonal anti-PC denominado BH8 (μ , κ).

Para la determinación de los perfiles de inhibición de los antisueros se utilizó el mismo ensayo, pero se añadieron a los pocillos 25 µl de dilución apropiada de suero (doble de la máxima dilución que permanece en la meseta de la curva de titulación, lo que permitió minimizar el efecto de la concentración de anticuerpos en el suero) y 25 µl de diluciones seriadas 1/3 de cloruro de PC (Sigma Chemicals, USA) en PBS-T-BSA, en lugar de los 50 µl de suero utilizados para la titulación. El análisis de los datos y la obtención del PC50 (concentración de PC libre que inhibe el 50% de la respuesta) y el índice de homogeneidad (*Ih*, indicativo de la pendiente de la curva, y por lo tanto, de la heterogeneidad de los anticuerpos presentes en el suero) se realizaron como se describió previamente (3). El resultado de estos ensayos puede dar una idea de la aidez de los antisueros, ya que el valor del PC50 está influido por la aidez (cuanto mayor sea el PC50 menor será la aidez).

Resultados y Discusión

La capacidad de respuesta de células formadoras de placas en los ratones BWF1 desciende con la edad (10, 14). Sin embargo, aunque el estudio de este tipo de respuestas aporta una importante información sobre el número de células que están secretando anticuerpos en un momento dado, proporciona, precisamente por este motivo, una información parcial y estática del proceso dinámico y extendido en el tiempo, que es la respuesta inmunológica humoral. Se analizaron por ello, los contenidos de anticuerpos IgM anti-PC en sueros de ratones hembras NZB/W de varias edades inyectados con PC-KLH. El título de anticuerpos aumenta hasta las 16 semanas para luego descender progresivamente hasta alcanzar mínimos (tabla I), resultado que puede interpretarse como una maduración del sistema inmunitario de los ratones hasta alcanzar el óptimo de respuesta y la posterior pérdida de esta competencia inmunológica a causa de la aparición, o de la expresión funcional, de las alteraciones inmunológicas propias de estos ratones (15).

Los títulos de anticuerpos séricos producidos por la inyección de antígenos con diferentes patrones de respuesta en rato-

Tabla I. Curvas de titulación de los anticuerpos IgM anti-PC en suero, de hembras BWF1 de diferentes edades.

Los resultados se obtuvieron con lotes de suero procedentes de 3-6 ratones. La edad se expresa en semanas.

Edad	Abs. máxima	Media	Desviación	Título
7	0,437	5,22	1,28	70
10	0,464	3,97	1,54	341
12	0,460	3,66	1,23	360
16	0,448	3,38	1,84	903
22	0,439	4,36	1,78	403
36	0,294	5,36	1,14	32
40	0,239	5,41	1,48	8

Tabla II. *Titulación de los anticuerpos IgM anti-PC en sueros de machos BWF1 inyectados con diferentes antígenos.*

Los ensayos se realizaron con lotes de sueros de 3-6 ratones. La edad se expresa en semanas.

Antígeno	Edad	Abs. Max.	Media	Desviación	Título
PC-KLH	10	0,468	2,72	1,50	>2566
	48	0,381	4,98	1,90	117
NMB	10	0,460	4,09	1,50	338
	48	0,438	4,53	1,54	227
PC-(NMB)HI	10	0,437	4,65	1,26	199
	48	0,381	6,02	1,09	38

nes NZB/W viejos (14), muestran que los títulos de los antisueros de ratones inyectados con NMB (antígeno que produce respuestas de células formadoras de placas muy similares en ratones jóvenes y viejos) eran prácticamente iguales en el suero de ratones de las dos edades (tabla II). Por el contrario, los sueros de ratones viejos inmunizados con PC-KLH mostraron títulos de anticuerpo muy inferiores a los detectados en jóvenes. El suero de ratones viejos inyectados con PC-(NMB)HI mostró unos títulos de anticuerpo inferiores a los detectados en suero de ejemplares inmunizados con PC-KLH. Estos resultados confirman que el descenso de la competencia inmunológica en ratones autoinmunes viejos se supera mediante la utilización de ciertos antígenos como el NMB, fenómeno que puede relacionarse con las propiedades de algunos antígenos particulares, como el PC acoplado a lipopolisacárido, capaces de superar la supresión neonatal por la activación directa de células B inmaduras T15 positivas (5).

Cuando se determinaron el $PC50$ y la heterogeneidad de los antisueros de ratones inyectados con los diferentes antígenos, se detectó un fuerte aumento de ambos en los ratones inyectados con PC-KLH (tabla III), fenómeno explicable por el cambio de afinidad fina de los anticuer-

pos observada en los ratones autoinmunes (10), por la sustitución de los anticuerpos T15⁺ por otros más heterogéneos y de diferente afinidad (12) o porque la supresión o inactivación de la respuesta provocada por el PC-KLH afecte principalmente a las células productoras de anticuerpos de alta afinidad (16). Es posible también, sin embargo, una interpretación de estos resultados desde el punto de vista inverso, es decir, que la débil capacidad inmunogénica del PC-KLH en animales viejos sea incapaz de inducir la rápida maduración de la afinidad de la respuesta que se observa en los NZB/W jóvenes (7), si bien esta explicación no parece probable ya que el PC-(NMB)HI, que presenta una capacidad de inducción de respuesta similar a la del PC-KLH, induce en ratones de las dos edades la formación de anticuerpos de la misma, o muy similar afinidad, en ratones de las dos edades.

Dado que el NMB y el PC-(NMB)HI, los dos antígenos que producen respuestas con iguales perfiles de inhibición en ratones de ambas edades, son también los que inducen respuestas que mantienen una elevada expresión de idiotipo T15 en individuos viejos (14), parece muy posi-

Tabla III. *Inhibición con hapteno por ELISA de sueros de ratones inyectados con diferentes antígenos.*

Los ensayos se realizaron con lotes de suero procedentes de 3-6 animales. La edad se expresa en semanas.

Antígeno	Edad	Dilución ensayada	PC50	Ih
PC-KLH	12	1:160	3,78	1,50
	48	1:10	2,65	0,75
NMB	12	1:40	3,85	2,16
	48	1:20	3,60	1,81
PC-(NMB)HI	12	1:20	3,72	1,98
	48	1:10	3,71	1,99

ble que el aumento del PC50 de los antisueros se deba a la sustitución de los anticuerpos T15⁺ por otros con una afinidad más heterogénea (12) y que presenten, en conjunto, una afinidad menor que ellos. Esta hipótesis está también apoyada por los estudios realizados en experimentos de inyección simultánea de dos antígenos, en los que, nuevamente, el perfil de inhibición de los antisueros está relacionado con la expresión del idiotipo T15 (datos no publicados).

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos 618/81 de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica y 84/1190 del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social. R. Seoane y A. Eiras disfrutaron becas del Plan de Formación del Personal Investigador, concedidas por el Ministerio de Educación y Ciencia.

Queremos agradecer a W. González (Departamento de Estadística, Facultad de Matemáticas, Santiago de Compostela) la ayuda prestada en la adaptación a nuestro caso particular del método no paramétrico utilizado para el cálculo del PC50.

Resumen

Se estudian los títulos de anticuerpos IgM y la avidez de los sueros de ratones autoinmunes NZB/W en respuestas antifosforilcolina inducidas por diferentes antígenos. Los resultados obtenidos demuestran que se produce, de forma dependiente de la edad, un descenso de la capacidad de producción de anticuerpos antifosforilcolina tras la inyección de fosforilcolina acoplada a hemocianina de lapa, descenso que no se observa, sin embargo, con una preparación antigénica de *Neisseria meningitidis* que induce de forma natural anticuerpos antifosforilcolina, pero sí cuando se utiliza como antígeno una modificación del anterior, consistente en su inactivación por calor y posterior acoplamiento artificial con el hapteno. Los estudios de inhibición por hapteno de los anticuerpos sugieren que este descenso de la capacidad de respuesta está acompañado de un descenso de la avidez y la homogeneidad de los antisueros, que puede estar relacionado con la

pérdida del dominio clonal idiotípico recientemente descrito en ratones NZB/W.

Palabras clave: NZB/W, Respuesta anti PC, Autoinmunidad, Título de anticuerpos.

Bibliografía

1. Caufield, M. J. y Shaffer, D.: *J. Immunol. Meth.*, 74, 205-215, 1984.
2. Evans, M. N., Williamson, W. E. y Irvine, W. J.: *Clin. Exp. Immunol.*, 3, 375-382, 1968.
3. Faro, J., Seoane, R., Eiras, A., Lareo, I., Couceiro, J. y Regueiro, B. J.: *Infect. Immun.*, 51, 224-232, 1986.
4. Faro, J., Seoane, R., Puentes, E., Ubeira, F. M. y Regueiro, B. J.: *Infect Immun.*, 48, 428-432, 1985.
5. Fung, J. y Khöler, H.: *J. Immunol.*, 125, 1998-2003, 1980.
6. Goldings, E. A.: *J. Immunol.*, 131, 2630-2634, 1983.
7. Jarvis, M. R., Gasperson, D. M., Kranz, D. M. y Voss, E. W.: *Mol. Immunol.*, 19, 525-533, 1982.
8. Katagari, T. y Fujiwara, M.: *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.*, 69, 306-310, 1982.
9. Katagari, T. y Fujiwara, M.: *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.*, 69, 397-399, 1982.
10. Park, Cl. L., Balderas, R. S., Fieser, T. M., Slack, J. H., Prud'homme, G. J., Theophilopoulos, A. N. y Dixon, F. J.: *J. Immunol.*, 130, 2161-2167, 1983.
11. Quan, Z. S., Dick, R. F., Regueiro, B. y Quintans, J.: *Eur. J. Immunol.*, 11, 643-649, 1981.
12. Quintans, J. y Quan, Z. S.: *J. Immunol.*, 130, 590-595, 1983.
13. Seoane, R., Faro, J., Eiras, A., Lareo, I., Cabezas, J. M. y Regueiro, B. J.: *IRCS Med. Sci.*, 14, 393-394, 1986.
14. Seoane, R., Faro, J., Eiras, A., Lareo, I., Couceiro, J. y Regueiro, B. J.: *Immunology*, 58, 329-334, 1986.
15. Smith, H. R. y Steinberg, A. D.: *Ann. Rev. Immunol.*, 1, 175-210, 1983.
16. Takemori, T. y Tada, T.: *J. Exp. Med.*, 140, 253-266, 1974.
17. Theophilopoulos, A. y Dixon, F. J.: *Immunol. Rev.*, 55, 179-216, 1981.
18. Vaitukaitis, J. L.: *Meth. Enzymol.*, 73, 46-52, 1981.
19. Wofsy, L.: *Meth. Enzymol.* 92, 477-478, 1983.

